

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月11日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04921

研究課題名(和文) アレルゲンの細胞内消化ペプチドによる免疫調節機構の解明と経口免疫療法への応用

研究課題名(英文) Peptides derived from intracellularly digested allergens, mechanisms of their immunomodulation and application to oral immunotherapy

研究代表者

松田 幹 (Matsuda, Tsukasa)

名古屋大学・生命農学研究科・教授

研究者番号：20144131

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：食物アレルギーにおいて、腸管から吸収されたアレルゲンがアナフィラキシーのような病理症状を誘発すると同時に、その分解断片ペプチドが経口免疫寛容や脱感作を誘導して症状を改善する場合もある。牛乳アレルギーにおけるアレルゲンについてその細胞内消化に焦点をあて、質量分析による微量定量解析により、IgEエпитープ領域と重複するものも含め複数のペプチドが腸上皮細胞の細胞内消化により生成し吸収されることを明らかにした。さらに、経口負荷試験陽性牛乳アレルギー患者血清からカゼインに対するIgEが高力価の血清を選別し、同定された細胞内消化ペプチドについてIgE結合による分画と免疫調節ペプチドの同定を進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

食物アレルギーにおいて消化管腔内と体内の間に位置する腸上皮細胞層によるアレルゲンの細胞内消化についてはほとんど着目されてこなかった。本研究により牛乳カゼインの細胞内消化分解ペプチドが化学的に同定、定量されたことは、腸上皮細胞による食品高分子成分の経細胞輸送の研究に新たな視点を与え、食品科学や消化器生物学の研究に重要な意義を持つものと考えられる。また、ヒト腸上皮様細胞レベルの知見ではあるが、食物アレルギーが腸管吸収される過程で細胞内消化により免疫制御ペプチドが生成する可能性を示唆したことは、免疫制御機能性ペプチドの開発研究や食物アレルギーの免疫療法への展開など大きな社会的波及効果を持つと思われる。

研究成果の概要(英文)：In food allergy, allergens absorbed from intestinal lumen could induce pathological symptoms such as anaphylaxis and, at the same time, peptide fragments derived from allergens could sometimes induce oral immunological tolerance and de-sensitization, leading to symptomatic improvement. We focused on intracellular digestion of allergen proteins in cow's milk allergy, and by using a MS-based nano-scale determination protocol showed that several peptides including ones with IgE epitopes were produced by intracellular digestion of intestinal epithelial cells and absorbed through transcytotic transport. Moreover, we screened high IgE-titer serum specimens among those from patients with symptomatic cow's milk allergy. Among those produced by such intracellular digestion, fractionation and identification of IgE-binding and immuno-modulatory peptides are now in progress.

研究分野：食品科学

キーワード：食物アレルギー 腸上皮細胞

## 1. 研究開始当初の背景

食物アレルギーの研究は、かつてのアレルゲンの分離・同定と精製アレルゲンをを用いた血清特異 IgE 抗体の臨床診断への応用を中心とした研究から、同定されたアレルゲンの IgE 抗体結合領域 (B 細胞エピトープ) と T リンパ球受容体結合領域 (T 細胞エピトープ) の特定と臨床診断および治療 (寛容誘導) への応用を目指した研究に移行していた。牛乳アレルギーにおいては、主要成分であるカゼインと乳清の  $\beta$ -ラクトグロブリンが主要アレルゲンと考えられていたが、カゼインの個々の構成成分 ( $\alpha$ s1-,  $\beta$ -,  $\kappa$ -カゼインなど) に関する報告は少なかった。我々の研究グループは、分離精製したカゼイン構成成分を用いて、経口感作マウスおよび牛乳アレルギー患者の血清を用いて、人乳には含まれない  $\alpha$ s1-カゼインが優勢なアレルゲン成分であることを明らかにしていた。また、以前の研究により、卵アレルギーの原因抗原であるオボアルブミンを用いて、ヒト腸上皮細胞層をオボアルブミンが透過する際にカテプシンによる消化を受けて断片化しカテプシン阻害剤によりオボアルブミンの透過量が顕著に増加することを示し、消化管内消化に加え腸上皮細胞層を通過する際のリソソーム酵素による細胞内消化もアレルゲンの消化・吸収に重要な役割を持つことを報告していた。アレルゲンの消化分解ペプチド断片の中には抗体やリンパ球受容体のエピトープを保持したものが含まれ、T 細胞エピトープおよび一次構造依存性 B 細胞エピトープを含むペプチド断片は、それぞれのリンパ球受容体に結合してリンパ球の分化や活性化を調節し、寛容や抑制応答を誘導することがあり、ペプチド断片ではマスト細胞の活性化にともなうアレルギー症状誘発のリスクが低いと、減感作・脱感作 (抗原に対する寛容体質となること) の誘導を目指す治療への応用が期待されていた。

## 2. 研究の目的

食物アレルギーにおいて、腸管から吸収されたペプチド断片が経口免疫寛容や脱感作を誘導してアレルゲン摂取に耐性を獲得する場合がある。一方、感作を増強して一層過敏な体質になることもある。このような二面性を持つアレルゲンペプチド断片の腸管吸収と免疫調節の機構について、ヒト腸上皮細胞を用いて解析して体内に吸収される (腸上皮細胞内消化により生成し基底側に放出される) アレルゲンペプチド断片を生化学的に同定し、そのペプチド断片とアレルギー IgE 抗体との結合性との関連を明らかにすることを目的とした。さらに、経口免疫療法でのアレルゲン摂取時に採取された患者血清を用いて IgE 抗体との反応性を調べることで経口免疫療法に有効なアレルゲンペプチド断片の開発を目指した。

## 3. 研究の方法

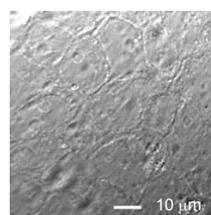
### 1) 培養腸上皮細胞によるアレルゲンの取り込みと細胞内消化

ヒト腸上皮様 Caco-2 細胞をコラーゲンコートした多孔性膜上で培養して分化させ、頂端・基底の細胞極性を持つ腸上皮様単層細胞層を形成させた (図 1)。無血清培地に交換した後、細胞層の頂端側にカゼインを添加し、24 時間培養し、基底側培地を回収した。回収した培地を、10 kDa 限外ろ過分離膜により脱塩およびペプチドを濃縮した。

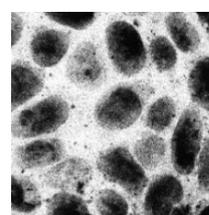
### 2) 質量分析によるカゼインの細胞内消化ペプチドの解析

濃縮した細胞内消化ペプチドをトリプシン、キモトリプシンでの酵素分解によりさらに低分子化して超微量液体クロマトグラフィー (nano-LC) で分画した。自動スポット装置を用いてカラム溶出画分をイオン化用マトリクスと混合して質量分析用プレートに添加し、レーザーイオン化飛行時間型 (MALDI-TOF) 質量分析計により質量スペクトルを得た。カゼイン酵素分解ペプチドに由来する二次分解断片 (プロダクトイオン) の質量情報 (MS/MS スペクトル) を用いた Mascot 検索 (Matrix Science) および ProteinPilot 検索 (AB SCIEX) によりペプチドを同定した。細胞内消化ペプチドの定量分析には、イオンスプレー型 LC-四重極イオントラップ (LC-QTRAP) 型質量分析計を用いた。

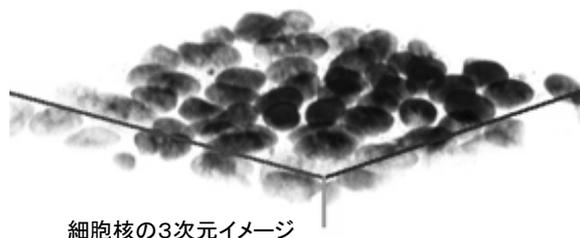
精製カゼインのトリプシン完全消化ペプチドを標準サンプルとして、酵素分解ペプチドに由来する二次分解断片 (プロダクトイオン) の質量情報をもとに、Mascot および ProteinPilot 検索によりカゼイン由来ペプチドを同定し、カゼインの 4 種のコンポーネントのそれぞれについてポリペプチド全長の半分強の配列をカバーするペプチド群を同定した。その中から各コンポーネントについてシグナル強度が高い数種



明視野 (微分干渉)



細胞核の染色像



細胞核の3次元イメージ

図1: 多孔性膜上で分化誘導したヒト腸上皮様細胞株Caco-2細胞の顕微鏡観察像

通常の培養皿で培養した場合と比べて細胞が扁平ではなく敷石上に並び嵩高く立体的な形態をとり、細胞間密着結合も強固となり頂端側と基底側に区切られた腸上皮様の単層細胞層を形成している。

のペプチドを選抜し、定量プロトコル (MRM method) を構築し、既知濃度のカゼイン標準試料を理論的完全消化産物と仮定して各コンポーネントの濃度を算出し、カゼイン由来ペプチドの定量用基準試料として用いて細胞内消化ペプチドと同時に定量プロトコルによる LC-QTRAP 質量分析を行った。

### 3) 牛乳アレルギー患者血清のスクリーニング

経口負荷試験陽性 (少量の牛乳を飲むことで即時型の症状が誘発される) 牛乳アレルギー患者血清 (32検体) は、研究協力者である伊藤直香博士 (東京大学医学部)、藤澤隆夫博士 (国立病院機構三重病院) らの研究グループから分与いただいた。これらの血清を用いて、カゼインおよびその  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\kappa$ -コンポーネント、さらに主要な乳清タンパク質に対する IgE 抗体価をパーオキシダーゼ標識-抗ヒト IgE 抗体と TMB (3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidine) 酵素基質キットを用いた ELISA により測定した。

## 4. 研究成果

### 1) ヒト腸上皮細胞の細胞内消化により生成したアレルゲンペプチドの検出と同定

超微量液体クロマトグラフィー (nano-LC) で分画し、レーザーイオン化飛行時間型 (MALDI-TOF) 質量分析計を用いて牛乳カゼイン由来ペプチドの高感度検出条件を検討し、多孔性膜上で培養、分化させたヒト腸上皮細胞株 Caco-2 が牛乳カゼインを細胞内に取り込んだ後に細胞内消化して基底側 (体内側) に排出したカゼイン分解ペプチド (2種類のコンポーネントに由来するペプチド) の同定に成功した。同定されたペプチドの数と種類が想定より少なかったため、MALDI 型の分析ではイオン化しにくいペプチドが存在する可能性を考え、さらに同定に加えて定量が可能となるイオンスプレー型 LC-四重極イオントラップ (LC-QTRAP) 型の質量分析計による解析を行った。精製カゼインのトリプシン消化ペプチドを標準サンプルとして分析し、カゼインの4種のコンポーネントのそれぞれについてポリペプチド全長の半分強の配列をカバーするペプチド群の同定ができる分析系を確立した。同定したカゼイン酵素分解ペプチドに由来する二次分解断片 (プロダクトイオン) の質量情報をもとに、未知ペプチド混合物からカゼイン由来ペプチドを同定し、その量を相対定量する方法 (MRM method) を構築した。この分析システムを用いて腸上皮細胞層の基底側培地に放出されたカゼインおよびそのペプチド断片について分析した結果、4種のコンポーネントそれぞれに対して設定した2-3種 (総計9種) のペプチドのうち、3種のコンポーネントに由来する総計7種のペプチドが検出された。

### 2) 細胞内消化により生成したアレルゲンペプチドの定量解析

既知濃度のカゼイン標準試料を *in vitro* 酵素処理することにより理論的完全消化産物を調製し、生成するカゼインペプチドの定量用基準試料として用いて LC-QTRAP 型の質量分析計による高感度定量分析を試みた。その結果、測定した同一のペプチド由来の4種のプロダクトイオンの定量値に大きなバラツキはなく、nanomole (nmol) から femtomole (fmol) のレベルのペプチドを定量できることが明らかとなった (図2)。そこでこの高感度定量分析法を用いて、ヒト腸上皮細胞株の細胞内消化により生成したカゼイン由来ペプチドを定量した。上皮細胞層の基底側に放出され同定された7種のカゼイン由来ペプチドの中で、 $\alpha$ s1-カゼイン N-末端近傍由来のペプチドと  $\alpha$ s2-カゼインの中央付近由来のペプチドが量的に優勢であり、添加後24時間に24穴プレート (底面積30 mm<sup>2</sup>) において、それぞれ800 fmol/well および600 fmol/well 程度であった。これらの2つのペプチドは、いずれも、合成ペプチドを用いた先行研究により牛乳アレルギー患者血清 IgE 抗体が認識することが報告されていたペプチド領域 (エピトープ) との部分的重複あるいは近傍に位置しており、Bリンパ球への抗原刺激によるアレルギー感作やマスト細胞への脱顆粒誘導など牛乳アレルギーにおける生理的、病理的な抗原刺激にこれらのペプチドが関与する可能性が示唆された。一方、 $\beta$ -カゼイン由来の中央付近と C-末端近傍の2種類のペプチドは、一桁低い50 fmol 程度であったが、IgE エピトープとの関連性は見られず、症状を誘発することなく減感作を誘導する候補ペプチドとなる可能性が示された。 $\kappa$ -カゼイン由来のペプチドは検出、定量限界以下の量であった。

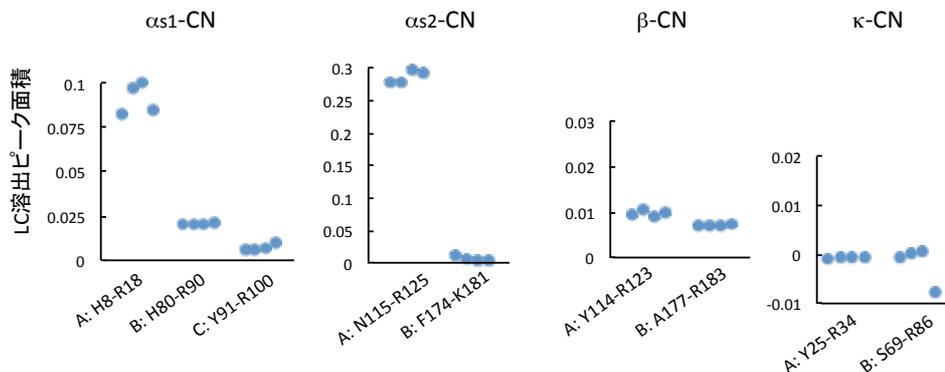


図2: LC-QTRAP型の質量分析計によるカゼイン細胞内消化産物の高感度定量分析  
縦軸は標準カゼイン分解ペプチドを基準にした4種のプロダクトイオンのLC溶出ピーク(質量スペクトルシグナル)の比率を示す。横軸はカゼイン(CN)コンポーネントのトリプシン分解ペプチドの中から選抜された2-3種のペプチドの両端のアミノ酸残基(番号)を示す。

### 3) アレルギー患者血清抗体を用いた IgE エピトープ含有ペプチドの濃縮の試み

これまでの成果から、腸上皮細胞基底側に排出されたカゼイン分解断片は、T 細胞受容体および、あるいは B 細胞受容体 (抗体) に結合する抗原エピトープを含み得るサイズであると判断し、アレルギー患者血清抗体が認識するエピトープの存在の有無を調べるために、抗体に結合するペプチドを上記の質量分析法で定量解析する実験系の確立を目指した。アレルギー患者血清と CN 細胞内消化産物での本実験の前に、マウス抗血清とカゼインの酵素消化産物を用いて予備実験を行った。特異性の異なる種々のプロテアーゼによるカゼイン消化産物に含まれる多様なペプチド群の質量分析法での定量条件を設定した。同時に消化分解ペプチドをカゼイン特異的マウス IgG と反応させ抗原エピトープを含むペプチドを免疫沈降させ、酸性緩衝液を用いてペプチドを抗体から遊離させ質量分析計による同定を試みた。免疫沈降物からのペプチドの遊離と分画の効率が悪いのか、細胞から放出される抗原ペプチドを同定できるレベルの検出感度に到達できなかった。この分析系の確立と平行して経口負荷試験陽性牛乳アレルギー患者血清についてカゼインおよびその  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\kappa$ -コンポーネント、さらに主要な乳清タンパク質に対する IgE 抗体価を測定し、カゼインの細胞内消化産物ペプチドと結合する IgE 抗体解析に適した血清のスクリーニングを行った。その結果、個人差が大きいものの平均値として、カゼインに対する IgE 抗体価は  $\alpha$ -ラクトグロブリンおよび  $\beta$ -ラクトアルブミンのそれぞれ 10 倍および 50 倍程度の高値を示し、さらに、 $\alpha$ s-および  $\beta$ -CN が IgE 結合の主要コンポーネントであることが明らかとなった。質量分析計による高感度検出定量系が確立でき次第、これらの患者血清を用いて IgE 結合性 CN ペプチドを分離し網羅的に解析・同定を進める予定である。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 7 件)

(1) Nao Sakurai Shunsuke Nishio Yuka Akiyama Shinji Miyata Kenzi Oshima Daita Nadano Tsukasa Matsuda Apical-to-basolateral transepithelial transport of cow's milk caseins by intestinal Caco-2 cell monolayers: MS-based quantitation of cellularly degraded  $\alpha$ - and  $\beta$ -casein fragments

The Journal of Biochemistry, 査読有, Volume 164, Issue 2, 113-125, 2018 doi: 10.1093/jb/mvy034.

名古屋大学学術機関リポジトリ

[URL] : [https://nagoya.repo.nii.ac.jp/?action=repository\\_uri&item\\_id=26178](https://nagoya.repo.nii.ac.jp/?action=repository_uri&item_id=26178)

(2) 平野可奈、窪田 慎、松田 幹

難消化性オリゴ糖・多糖の摂取と腸管免疫機能

ルミナコイド研究/日本食物繊維学会誌、査読有、21、57-68、2017 年 12 月 31

[学会発表] (計 20 件)

(1) 安藤百花、田中彩華、西尾俊介、宮田真路、大島健司、灘野大太、松田幹

乳児期マウスにおける乳成分の消化吸収機構：消化管でのカゼインの消化動態およびアミノ酸輸送体遺伝子発現の解析、日本酪農科学会シンポジウム 2018、和洋女子大学(千葉県市川市)2018 年 9 月

(2) Tsukasa Matsuda

Do protein complexes act as matrixes affecting the proteolytic production of dairy bioactive peptides?

International Dairy Federation: World Dairy Summit 2017, Dairy Science and Technology Conference, Belfast, UK, 2017 年 11 月

(3) 櫻井那央、西尾俊亮、秋山友香、大島健司、灘野大太、松田幹

Caco-2 細胞における牛乳カゼインミセルの細胞内消化と経細胞極性輸送：LC-MS/MS による定量的解析、日本農芸化学会 2017 年度大会、京都女子大学、2017 年 3 月

(4) 櫻井那央、大島健司、灘野大太、長門 (伊藤) 直香、藤澤隆夫、松田幹

牛乳アレルギーの経口免疫療法における血清特異抗体の変動と予後および寛容誘導との関連 第 70 回日本栄養・食糧学会中部支部大会、岐阜大学、2016 年 11 月

(5) 長江明日香、灘野大太、松田幹、若林裕之、山内恒治、阿部文明、大島健司

GFP 融合ラクトフェリンの腸管上皮細胞内輸送分岐の解析

日本ラクトフェリン学会第 7 回学術集会 2016 年度臨床ラクトフェリン研究会合同大会、昭和

大学旗の台キャンパス、2016年10月

(6) 櫻井那央、秋山友香、西尾俊亮、大島健司、灘野大太、松田幹  
ヒト腸上皮細胞による牛乳カゼインの頂端側からの取込み基底側への分解ペプチドの放出  
平成28年度酪農科学シンポジウム、神奈川県藤沢市、2016年9月

〔図書〕(計 3件)

(1) 松田 幹 序章「ブラックボックスへの探針と光明」、腸内細菌-宿主のクロストークと  
食事要因、pp1-16、日本栄養・食糧学会 監修 園山 慶, 森田 達也, 辻 英明 責任編  
集、建帛社、2019年5月

〔産業財産権〕

○出願状況(計 2件)

○取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：大島健司

ローマ字氏名：Oshima Kenzi

所属研究機関名：名古屋大学

部局名：生命農学研究科

職名：助教

研究者番号(8桁)：90391888

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：伊藤直香、藤澤隆夫

ローマ字氏名：Ito Naoka, Fujisawa Takao

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。